

VaccineNo. Publication (Sec.) : ☐ US4197290

Date de publication : 1980-04-08

Inventeur : YOSHIDA KOSAKU [JP]

Déposant : YOSHIDA KOSAKU [JP]

Numéro original : ☐ FR2410043

No. d'enregistrement : US19780947103 19780929

No. de priorité : JP19770118426 19770930

Classification IPC : A61K39/02

Classification EC : A61K39/085Brevets correspondants : ☐ FR2468372, ☐ GB2009771, JP1071643C, ☐ JP54052794, JP56011436B

Abrégé

A vaccine effective against challenge infections, such as bovine mastitis is prepared from Staphylococcus aureus or Staphylococcus epidermidis strain.

Données fournies par la base d'esp@cenet - I2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(02)

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :
(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

2 410 043

A1

DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION

N° 78 28133

(21)

(54)

Nouveau vaccin contre la mammite de la vache et son procédé de production.

(51)

Classification internationale (Int. Cl.²). C 12 K 5/00; C 12 D 13/04.

(22)

Date de dépôt 2 octobre 1978, à 15 h 49 mn.

(33) (32) (31)

Priorité revendiquée : *Demande de brevet déposée au Japon le 30 septembre 1977, n. 118.426/1977 au nom du demandeur.*

(41)

Date de la mise à la disposition du
public de la demande B.O.P.I. — «Listes» n. 25 du 22-6-1979.

(71)

Déposant : YOSHIDA Kosaku, résidant au Japon.

(72)

Invention de :

(73)

Titulaire : *Idem* (71)

(74)

Mandataire : Rinuy, Santarelli.

La présente invention concerne un procédé de production d'un vaccin destiné au traitement préventif et curatif de la mammite de la vache.

Il est connu d'extraire un polysaccharide appelé
5 SSA ("Smith Surface Antigen") ou SPA ("Staphylococcal Polysaccharide Antigen") de la souche diffusée en milieu de Smith de Staphylococcus aureus (S. aureus) le réactif de SSA ou SPA déterminant la protection d'animaux contre une infection provoquée par des souches de S. aureus. Toutefois, la protection
10 ainsi produite est spécifique de souches diffusées en milieu de Smith ou de souches similaires. Ces diverses souches sont considérées comme étant des types individuels d'organismes encapsulés, comprenant des souches du type à capsule de Wiley qui sont identiques aux souches diffusées en milieu de Smith
15 ou aux souches similaires.

Jusqu'à présent, l'extraction du polysaccharide des capsules de souches de S. aureus a dû être effectuée en utilisant la souche diffuse en milieu de Smith, étant donné que des souches encapsulées de S. aureus autres que les organismes
20 diffusés en milieu de Smith ou des organismes similaires, n'ont pas encore été isolées.

Il est connu que les réactifs ainsi extraits n'exercent aucun effet préventif vis-à-vis de la mammite de la vache.

Le but de la présente invention est de trouver un
25 procédé d'extraction du polysaccharide de souches encapsulées de Staphylococcus en vue de produire un vaccin destiné au traitement préventif et curatif de la mammite staphylococcique de la vache.

Comme on le montrera ci-après, cet objectif a été
30 atteint ainsi que d'autres par l'immunisation de troupeaux de bovidés à l'aide d'un vaccin comprenant un polysaccharide capsulaire dérivé de souches encapsulées.

Généralement, des souches de S. aureus non encapsulées produisent une colonie de type morphologique compact dans
35 le milieu formé de gélose molle contenant du sérum, qui consistent par exemple en une infusion coeur-cerveau (ICC), en gélose et en sérums normaux de lapin, tandis que des souches encapsulées de S. aureus présentent en ces milieux une croissance de type

diffus. Toutefois, les souches encapsulées de type diffus donnent des colonies dont la morphologie se transforme en adoptant le type de croissance compacte dans le milieu SSA contenant les anti-sérums de souches homologues, tandis qu'il n'y a pas de changement du type de croissance dans le cas d'anti-sérums de souches hétérologues. Tout type diffus de souches encapsulées de S. aureus donnant des colonies dont la morphologie est du type compact dans le milieu SSA contenant des sérums anti-souches diffuses de Smith sera désigné ci-après par la lettre A. Une seconde souche qui produit des colonies à morphologie de type diffus dans le milieu SSA contenant des sérums anti-type A ne produit toutefois que des colonies à morphologie de type compact dans SSA contenant des anti-sérums homologues, cette seconde souche étant considérée comme appartenant à un type B. Une troisième souche qui produit des colonies diffuses dans le milieu SSA contenant des sérums anti-type A et/ou anti-type B ne produit toutefois que des colonies à morphologie de type compact dans le milieu SSA contenant des anti-sérums homologues, cette troisième souche étant considérée comme appartenant au type C. On a désigné de la même façon les types D, E, F, etc. En utilisant ces souches de S. aureus de type capsulaire sérologiquement différent, on a extrait des polysaccharides capsulaires de la façon suivante. Les organismes cultivés sur le milieu "110" modifié, qui sera défini ci-après, sont traités à l'aide d'un oscillateur à ultrasons pour obtenir la matière capsulaire puis les capsules sont séparées de cette matière par centrifugation. Les acides nucléiques, les protéines et les lipides sont enlevés de la surface de cellule et de la fraction capsulaire par l'action de ribonucléase, de désoxyribonucléase, de chloroforme contenant du butanol, d'acétone et d'éther. Les polysaccharides ainsi obtenus protègent des animaux d'une infection provoquée par des souches encapsulées homologues.

Généralement, les souches de S. epidermidis ont été considérées comme non pathogènes envers les animaux et l'homme. Toutefois, des infections causées par ces souches constituent depuis quelques temps un problème, bien que le facteur pathogénique provoquant ces infections reste inconnu.

Après de nombreuses expériences, l'importance de la capsule dans l'établissement d'infections dues à des couches encapsulées de S. epidermidis vient d'être reconnue, et n'avait pas été signalée jusqu'à présent. Le polysaccharide capsulaire
5 provenant de souches encapsulées de S. epidermidis s'est montré efficace en tant que vaccin pour l'immunisation active contre des infections staphylococciques.

Il y a lieu de remarquer qu'une immunisation passive de souris avec un sérum de lapin hyperimmun préparé avec la
10 souche ATCC 31432 (SMU 76) de S. epidermidis, qui a été isolée par la Demanderesse, est capable d'assurer la protection contre des infections dues à des souches homologues. De même, une activité de protection passive de cet immun-sérum de lapin pourrait être supprimée par l'addition de la souche SMU 76.
15 Lorsque des souches de S. epidermidis virulentes pour la souris exercent également une activité, par exemple l'aptitude à absorber l'activité protectrice passive de la souche anti-SMU 76 de lapin, on peut les considérer comme étant des souches encapsulées de S. epidermidis.

20 La souche encapsulée de S. epidermidis peut être isolée d'une culture de souches de S. epidermidis dans un bouillon consistant en une infusion coeur-cerveille, ou dans d'autres bouillons de ce type tels que le bouillon n° 110.

On peut obtenir la culture en faisant incubé ce
25 bouillon de 20 à 40°C et de préférence de 26 à 37°C. Les organismes sont ensuite isolés par centrifugation, de préférence à environ 7000 x g. La centrifugation est effectuée pendant une période de 10 minutes à 1 heure, de préférence pendant 20 minutes. Les organismes peuvent être lavés le cas échéant avec une solu-
30 tion physiologique stérile de chlorure de sodium. Les organismes ainsi recueillis sont ensuite soumis à un test d'activité pathogène par mise en suspension dans du sérum physiologique, la turbidité étant ajustée à la densité optique 1,0 par spectrophotométrie à 430 mμ. La suspension cellulaire est ensuite diluée
35 dans le rapport de 1:10 conformément à la méthode de comptage sur plaque, avec du sérum physiologique. On injecte par voie intrapéritonéale 0,5 ml de cette dilution à 5 souris pesant environ 15 g. Lorsque plus de quatre souris sont tuées moins

de 7 jours après l'injection des souches de S. epidermidis, ces souches sont considérées, expérimentalement, comme étant virulentes pour la souris.

Ce sont les souches virulentes de S. epidermidis qui sont intéressantes à utiliser dans la préparation du vaccin de l'invention. En particulier, la souche ATCC 31432 (SMU 76) de S. epidermidis s'est montrée particulièrement efficace comme source de vaccin.

Un vaccin tué à la chaleur peut être préparé en formant une suspension cellulaire des organismes préparés comme décrit ci-dessus dans du sérum physiologique. La température à laquelle l'organisme est tué n'est pas déterminante, pour autant qu'elle est suffisante à cette fin. Un chauffage à des températures d'environ 121°C pendant environ 15 minutes s'est révélé satisfaisant. Le vaccin tué à la chaleur peut être utilisé directement pour une immunisation active ou bien on peut l'utiliser pour préparer un vaccin destiné à une immunisation passive en utilisant un animal-hôte convenable tel que le lapin, à partir duquel on obtient un sérum hyperimmun par les opérations connues. Il est préférable d'utiliser la souche ATCC 31432 (SMU 76) de S. epidermidis pour préparer le vaccin en vue de l'immunisation active ou passive. La structure de cette souche particulière a été mise en évidence au microscope électronique.

Un vaccin particulièrement apprécié comprend le polysaccharide capsulaire associé à l'organisme S. epidermidis encapsulé. Le polysaccharide peut être obtenu en cultivant les cellules dans un lieu convenable tel que le bouillon "110" modifié ou un bouillon coeur-cerveau, la culture étant suivie d'un traitement à l'oscillateur à ultrasons et d'une centrifugation. Les polysaccharides capsulaires sont contenus dans la phase surnageante et sont recueillis.

La dose de vaccin administrée à l'animal à protéger est suffisante pour provoquer la réponse désirée de production d'anticorps. Généralement, des doses de 0,0066 à 0,66 mg/g de poids corporel se sont montrées satisfaisantes. Des injections périodiques du vaccin sont nécessaires pour maintenir les taux indispensables d'anticorps. Le vaccin peut être administré

à l'animal de la façon nécessaire pour provoquer une réponse convenable de production d'anticorps. Ces injections peuvent être effectuées une fois par semaine, une fois par quinzaine, une fois par mois ou même moins souvent, pourvu que le taux
5 désiré d'anticorps soit maintenu chez l'animal. Dans le cas des vaches, des doses d'environ 0,07 à 0,11 mg/kg se sont montrées efficaces lorsqu'on les a administrées en deux injections à 14 jours d'intervalle. Le vaccin préféré est le polysaccharide capsulaire obtenu en cultivant S. epidermidis ATCC 31432 ou
10 S. aureus, souches A et B.

D'autres détails de la présente invention ressortent des exemples suivants, donnés à titre non limitatif.

EXEMPLE 1

Une souche diffuse selon Smith est cultivé à 37°C
15 pendant environ 18 heures dans un milieu formé d'une infusion coeur-cerveille. Les organismes sont ensuite recueillis par centrifugation à 7000 x g pendant 20 minutes et mis en suspension dans une solution à 0,85 % de NaCl après un lavage avec la solution à 0,85 % de NaCl par centrifugation. La turbidité
20 de cette suspension bactérienne est ajustée à une densité optique de 1,0 à 430 mμ et la suspension est autoclavée à 121°C pendant 15 minutes pour produire un vaccin "tué à la chaleur". On injecte 1,5 ml du vaccin tué par la chaleur dans la veine auriculaire du lapin trois jours consécutifs pendant trois se-
25 maines. Dix jours après l'injection finale, on prélève le sang du lapin et on en sépare le sérum. Toutefois, lorsque le titre du sérum est insuffisant, on effectue les injections de rappel. L'activité de l'anti-sérum est titrée comme suit : le sérum d'essai est filtré sur une membrane à pores de diamètre inférieur à 0,6 μ. Le sérum est dilué selon un système de dilution
30 d'un facteur 2, de 1:2 à 1:128, avec une solution à 0,85 % de NaCl. La souche diffuse selon Smith est cultivée dans le bouillon d'infusion coeur-cerveille à 37°C pendant environ 18 heures puis diluée à 10⁻⁶ avec une solution stérile de NaCl
35 à 0,85 %. On verse 0,1 ml de l'anti-sérum dilué ci-dessus et 0,1 ml de suspension bactérienne diluée dans des tubes à essai stériles puis on ajoute 10 ml de l'infusion coeur-cerveille

contenant 0,15 % de gélose, que l'on maintient à 45-50°C après autoclavage à 121°C pendant 15 minutes.

Les tubes à essai sont maintenus à 4°C pendant 30 à 60 minutes pour solidifier le milieu. Ensuite, on les fait
5 incuber à 37°C et on détermine la morphologie des colonies au bout de 18 à 24 heures. La souche produit alors des colonies compactes à diffuses dans le milieu SSA, selon la concentration de l'anti-sérum. Dans ce test, on choisit comme unité la dilution maximale d'anti-sérum donnant des colonies à morphologie
10 de type compact et on utilise deux unités/0,1 ml d'anti-sérum pour les autres essais. Lorsque des souches inconnues encapsulées et diffuses du type S. aureus produisent une croissance de type compact dans le milieu SSA contenant le sérum anti-souche diffuse selon Smith, ces souches sont considérées comme
15 appartenant au type A. Lorsqu'une seconde souche a une croissance de type diffus dans le milieu SSA contenant le sérum anti-souche diffuse selon Smith, on prépare un vaccin tué à la chaleur et on l'injecte à un lapin en vue de la préparation de l'anti-sérum. La seconde souche ne présente une croissance de type
20 compact que dans le milieu SSA contenant des anti-sérums de souches homologues. Ce type de souches représentatives est la souche NS58D et les souches présentant des caractéristiques sérologiques similaires sont considérées comme appartenant au type B. Selon la même méthode, lorsque la troisième souche a
25 une croissance de type diffus dans le milieu SSA contenant des sérums anti-type A et/ou anti-type B, un vaccin tué par la chaleur est formé en vue de la préparation d'anti-sérum. Cette souche ne produit des colonies de type compact que dans le milieu SSA contenant l'anti-sérum de souches homologues. Ce type
30 de souche représentatif est la souche NS41D et les souches présentant des caractéristiques sérologiques similaires sont considérées comme appartenant au type C. La souche représentative du type D, qui est la souche NS68D, est déterminée de la même façon. En ce qui concerne les souches des types A, B, C et D,
35 les hétérogénéités sérologiques sont en outre élucidées par les tests d'absorption pour l'activité de conversion, avec passage de la croissance de type diffus à la croissance de type compact dans le milieu SSA contenant l'anti-sérum, en utilisant

chaque type de cellule entière. L'activité de conversion est en outre considérée comme spécifique de l'anticorps anti-capsulaire relatif à chaque souche. Par ce procédé, on est parvenu à isoler des types nouveaux, à savoir les types B, C et D; 5 toutefois, d'autres souches typiques, à savoir des types E, F, G, etc., ont été impliquées dans la présente invention et ont pu être isolées. Ces différentes souches encapsulées de S. aureus ont été cultivées dans le milieu suivant : on dissout 10 g de peptone dans 50 ml de solution à 3 % de NaCl à 4°C, en 10 deux jours. On ajoute à ce dialysat 50 ml de tampon au phosphate 1,0 M (Na_2HPO_4 et KH_2PO_4) de pH 7,2, 10,0 g de mannitol, 2,0 g de lactose, 5,0 g de K_2HPO_4 et 5,0 g de casamino-acide et on autoclave le mélange à 121°C pendant 15 minutes. Ce milieu est appelé milieu modifié "110". La souche de S. aureus encapsu- 15 lée, par exemple la souche diffuse selon Smith, est cultivée dans 300 ml de bouillon modifié "110" à 37°C pendant environ 18 heures. Cinq ml de cette culture sont inoculés dans une boîte de Petri contenant environ 20 ml du milieu modifié "110" renfermant 1,5 % de gélose, et la culture est effectuée à 37°C 20 pendant environ 18 heures. Les organismes sont enlevés à l'aide d'un racloir et sont traités à l'aide d'un oscillateur à ultrasons (10 kC) pendant 5 minutes. Ce traitement ne provoque pas de réduction du nombre des cellules vivantes. La solution est centrifugée à 7000 x g pendant 20 minutes et la liqueur 25 surnageante est transférée dans un sac à dialyse. On concentre la liqueur surnageante en utilisant du polyéthylèneglycol de poids moléculaire 6000, à 4°C pendant environ 18 heures. La matière concentrée est dissoute à un pH de 7,2 dans un tampon au phosphate M/15, et la dissolution est suivie d'addition 30 respective de 50 µg/ml de ribonucléase et de 10 µg/ml de déoxyribonucléase. Les matières ainsi traitées sont maintenues à 37°C au bain-marie pendant 30 minutes. On ajoute un volume égal de chloroforme contenant du n-butanol dans le rapport de 1:5. On agite le mélange par secousses pendant environ 30 35 minutes et on enlève la phase supérieure après centrifugation à 1000 x g pendant 15 minutes. On répète cette opération jusqu'à ce que la phase intermédiaire de couleur blanche ait disparu. La phase supérieure est ensuite dialysée contre un tampon au

phosphate 1/15M, de pH égal à 7,2, à 4°C pendant environ 18 heures. On ajoute ensuite de l'acétate de sodium jusqu'à concentration finale de 3 % (pH 6,3) à la matière ainsi obtenue et on maintient le mélange à 4°C pendant environ 18 heures après

5 l'addition de 5 volumes d'alcool éthylique à 95 %. Le précipité résultant est recueilli par centrifugation à 1000 x g pendant 15 minutes puis il est redissous dans de l'acétate de sodium à 3 % . Le traitement à l'alcool du précipité est répété trois fois et cinq volumes d'acétone sont ensuite ajoutés. Le mélange

10 est agité et la liqueur surnageante est jetée après centrifugation à 1000 x g pendant 5 minutes. De l'éther éthylique est ajouté au précipité, puis évaporé. La substance résultante est un polysaccharide capsulaire et la préparation est effectuée pour chaque type de souche. Les polysaccharides obtenus présentent

15 des caractéristiques sérologiques différentes dans les tests de diffusion en gélose, les expériences de protection des souris et les tests d'absorption de l'activité de conversion des anti-sérums. La dose protectrice minimale de ces polysaccharides capsulaires pour des souris pesant 15 à 20 g a été trouvée

20 égale à 5 µg par souris.

EXEMPLE 2

On cultive la souche SMU 76 de S. epidermidis et on prépare une suspension cellulaire dans une solution physiologique de sel de turbidité égale à 1,0 unité de densité optique.

25 On chauffe la suspension à 121°C pendant 15 minutes pour produire un vaccin "tué à la chaleur". On injecte par voie intraveineuse 1 ml de ce vaccin tué à la chaleur à un lapin pesant 2 kg, pendant une période de 3 jours consécutifs au cours d'une semaine. Dix jours après, on adopte un régime de 3 à 5 in-

30 jections hebdomadaires, et on mesure l'activité des anticorps du sérum hyperimmun de lapin par la méthode suivante :

On chauffe à 56°C pendant 30 minutes 0,5 ml d'immunsérum de lapin puis on effectue une dilution en série, d'un facteur 2 en utilisant une solution à 0,85 % de NaCl. On ajoute

35 à la dilution 0,1 ml du vaccin tué à la chaleur, on agite correctement, on maintient le mélange au bain-marie à 37°C pendant 2 heures puis on le fait incuber à 4°C pendant environ

18 heures. On mesure le titre d'agglutination bactérienne. Lorsque la dilution maximale du sérum, présentant une agglutination bactérienne, est inférieure à 1:128, on administre d'autres injections du vaccin.

- 5 Avec les souches d'organismes SMU-76 ou similaires ainsi obtenues, on peut observer une activité protectrice contre des infections provoquées par ces souches, tant par immunisation active que par immunisation passive chez la souris, et on observe une homogénéité sérologique avec chacune des autres
- 10 souches. De même, il a été démontré que ce phénomène peut être considéré comme étant lié à des substances spécifiques existantes dans la capsule. De plus, la structure capsulaire de cette souche a pu être mise en évidence par l'étude au microscope électronique.
- 15 Extraction du polysaccharide capsulaire :
On ajoute 10 g d'une peptone à 50 ml de solution à 3 % de NaCl. Après dissolution de la peptone à chaud, on transfère la solution dans un sac à dialyse et on procède à la dialyse vis-à-vis de 950 ml de solution à 3 % de NaCl à 4°C pendant
- 20 deux nuits. On ajoute à ce dialysat 50 ml de solution tamponnée au phosphate 1,0M de pH égal à 7,2 (Na_2HPO_4 , KH_2PO_4), 10 g de mannitol, 2,0 g de lactose, et 5,0 g de K_2HPO_4 . On autoclave le mélange à 155°C pendant 10 minutes. On a suggéré d'appeler ce milieu bouillant modifié "110". La souche SMU-76 est cultivée
- 25 dans 300 ml de bouillon modifié "110" à 37°C pendant 24 heures. On verse dans 20 ml de ce bouillon contenant 1,5% de gélose, 5 ml de la suspension de cellules en cours de croissance indiquée ci-dessus. On laisse reposer la solution à 37°C pendant 24 heures puis on enlève les organismes au racloir. On les traite pendant
- 30 5 minutes au moyen d'un oscillateur à ultrasons de 10 kC. Après ce traitement, on n'observe pas de réduction du nombre des cellules viables. On centrifuge les cellules à 7000 x g pendant 20 minutes puis on transfère la liqueur surnageante dans un sac à dialyse. On effectue une centrifugation avec du polyéthylène-
- 35 glycol de poids moléculaire égal à 6000, à 4°C, on procède à une dialyse vis-à-vis d'une solution tamponnée au phosphate 15M et on forme un précipité dans la solution par l'addition

d'éthanol. On redissout ce précipité dans une solution tamponnée au phosphate, en ajoutant un volume égal de chloroforme et de n-butanol dans le rapport de 5:1. On agite correctement en utilisant un homogénéiseur. Le précipité blanc obtenu par ce traitement est séparé par centrifugation et le traitement est répété jusqu'à ce qu'il n'apparaisse plus de précipité. Après élimination des protéines, on ajoute du citrate de sodium à la phase hydrosoluble, à une concentration finale de 3 %. On ajoute encore 5 volumes d'éthanol et on recueille le précipité résultant par centrifugation.

On ajoute au précipité un volume correct d'acétone, on mélange convenablement puis on jette la liqueur surnageante obtenue par centrifugation. Ensuite, on ajoute de l'éther au précipité et on suit un mode opératoire semblable à celui qui a été indiqué ci-dessus. Enfin, on sèche le précipité sous vide. On obtient ainsi le polysaccharide désiré.

Lorsqu'on utilise une souche semblable à la souche SMU-76 à la place de cette dernière, on isole encore un polysaccharide en suivant le mode opératoire décrit ci-dessus.

Il a ensuite été confirmé que les propriétés sérologiques du polysaccharide ainsi obtenu étaient différentes de celles des souches capsulaires des types A, B, C et D de S. aureus.

Par l'immunisation active de souris avec ce polysaccharide (10 µg de polysaccharide pour 15 à 20 g de souris), on protège les animaux d'une infection provoquée par des souches SMU-76 ou des souches analogues. De même, une activité quantitative minimale de sérum hyper-immun de lapin préparée avec des souches SMU-76 ou des souches similaires protégeant des souris d'une infection provoquée par 10^9 organismes des souches SMU-76 ou similaires, a pu être totalement absorbée avec 5 mg de ces organismes. Toutefois, des souris immunisées avec le polysaccharide provenant de souches non encapsulées de S. epidermidis par la méthode décrite ci-dessus n'ont pas été immunisées vis-à-vis d'une infection provoquée. De même, il y a lieu de remarquer que l'activité de protection de la souris d'un sérum hyper-immun de lapin préparé avec des souches SMU-76 ou des souches similaires n'a pas été absorbée par des souches non encapsulées de S. epidermidis.

EXEMPLE 3

Des numérations leucocytaires ont été effectuées sur le lait provenant de quatre trayons de deux groupes de vaches, les vaches d'un groupe étant vaccinées contre l'infection et
5 les vaches de l'autre groupe constituant un groupe témoin. La paire antérieure de trayons partage un système lymphatique, en sorte que la probabilité d'infection d'un second trayon antérieur, lorsque le premier est infecté, est égale à environ 0,80. Il en est de même de la paire postérieure. La probabilité d'in-
10 fection d'avant en arrière est faible (environ 0,4).

Les mesures ont été effectuées comme suit :

Dix jours après le prélèvement initial d'échantillons, l'animal est vacciné. Une semaine après l'injection, le second échantillon est prélevé. Une semaine après le second échantillon,
15 un troisième échantillon est prélevé et une seconde injection est administrée. Les quatrième et cinquième échantillons sont prélevés respectivement 30 et 60 jours après la seconde injection.

Un troupeau de 196 vaches, à la prison d'état de Reidsville, est traité comme décrit ci-dessus avec le vaccin
20 de l'exemple 2. On constate que :

1. Le pourcentage de mammite staphylococcique de la vache est réduit de moitié une semaine après la seconde injection tandis que le degré d'infection du groupe témoin reste à peu près constant, et il en est ainsi pendant 30 jours.

25 2. Une semaine après la seconde injection, le degré d'infection streptococcique chez le groupe vacciné est réduit d'environ 45 % tandis que le degré d'infection du groupe témoin reste constant, et il en est ainsi pendant 30 jours après la seconde injection, excepté une légère élévation du degré d'in-
30 fection dans le groupe vacciné. Trente jours après la seconde injection, le degré d'infection du groupe vacciné est passé de 45% à un maximum de 60% de son niveau précédent, tandis que le degré d'infection dans le groupe témoin est resté essentiellement constant.

35 Il va de soi que la présente invention n'a été décrite qu'à titre explicatif, mais nullement limitatif et que de nombreuses modifications peuvent y être apportées sans sortir de son cadre.

REVENDEICATIONS

1. Procédé pour isoler un polysaccharide capsulaire de souches encapsulées, sérologiquement différentes, de Staphylococcus aureus, caractérisé par le fait qu'il consiste:

- 5 a. à cultiver ladite souche de S. aureus dans une gélose molle au sérum, qui est additionnée de sérum anti-souche diffuse de Smith;
- b. à isoler une souche diffuse de type A à croissance de type compact dans ladite gélose molle au sérum;
- 10 c. à cultiver la souche de S. aureus dans une gélose molle au sérum contenant des anti-sérums relatifs aux souches du type A;
- d. à isoler des secondes souches qui présentent encore une croissance de type diffus dans la gélose molle au sérum;
- 15 e. à cultiver ladite souche de S. aureus dans une gélose molle au sérum contenant des anti-sérums relatifs auxdites secondes souches;
- f. à isoler une souche du type B qui présente une croissance de type compact dans la gélose molle au sérum; et
- 20 g. à isoler un polysaccharide capsulaire des souches de type B.

2. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé par le fait que S. aureus est cultivé dans la gélose molle au sérum contenant des anti-sérums relatifs aux cinquièmes souches,

25 les cinquièmes souches du type C qui présentent une croissance de type compact dans la gélose molle au sérum sont isolées et un polysaccharide capsulaire est isolé de ces souches de type C.

3. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé

30 par le fait que des sixièmes souches sont isolées d'une culture en gélose molle au sérum contenant des anti-sérums relatifs aux souches des types A, B et/ou C; des septièmes souches du type D présentant une croissance compacte dans la gélose molle au sérum contenant des anti-sérums relatifs à ces septièmes souches

35 sont isolées; et un polysaccharide capsulaire est isolé de ces souches de type D.

4. Procédé de production d'un vaccin tué à la chaleur à partir d'une souche de S. epidermidis ATCC 31432, caractérisé

par le fait qu'il consiste :

- a. à cultiver la souche de S. epidermidis dans un bouillon de culture;
- b. à isoler la suspension cellulaire dudit bouillon; et
- 5 c. à désactiver à la chaleur la souche en question et à recueillir le vaccin tué à la chaleur.

5. Procédé suivant la revendication 4, caractérisé par le fait que la souche inactivée à la chaleur est injectée à un animal-hôte pour déclencher une réponse avec production
10 d'anticorps et le sérum contenant les anticorps de l'hôte en question est recueilli.

6. Procédé de production d'un vaccin à base d'un polysaccharide doué d'activité immunisante contre une infection, caractérisé par le fait qu'il consiste :

- 15 a. à cultiver une souche de S. epidermidis ATCC 31432 dans un bouillon de culture;
- b. à isoler les cellules dudit bouillon et
- c. à soumettre ces cellules à l'action d'un oscillateur à ultrasons et à une élimination des protéines puis à
20 recueillir ledit polysaccharide.

7. Le vaccin produit par un procédé suivant l'une des revendications 4, 5 et 6.

8. Médicament destiné notamment à l'immunisation de bovins contre une maladie infectieuse, caractérisé par le fait
25 qu'il renferme un polysaccharide encapsulé dérivé de S. epidermidis ATCC 31432 en quantité suffisante pour déclencher une réponse immunisante par production d'anticorps.

9. Médicament destiné notamment à immuniser des bovins contre une maladie infectieuse, caractérisé par le fait
30 qu'il contient une quantité d'une souche encapsulée de S. epidermidis ATCC 31432 désactivée par la chaleur, suffisante pour déclencher une réponse immunisante avec production d'anticorps.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)